

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E
GENÉTICA

ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL DE CRUSTINAS EM
CAMARÕES (*Litopenaeus vannamei*) EXPERIMENTALMENTE
DESAFIADOS COM A BACTÉRIA *Vibrio harveyi*

Nicolas Argenta da Conceição

Florianópolis
2018

Nicolas Argenta da Conceição

ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL DE CRUSTINAS EM
CAMARÕES (*Litopenaeus vannamei*) EXPERIMENTALMENTE
DESAFIADOS COM A BACTÉRIA *Vibrio harveyi*

Trabalho de Conclusão de Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Santa
Catarina

Orientador: Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Argenta da Conceição, Nicolas
ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL DE CRUSTINAS EM
CAMARÕES (*Litopenaeus vannamei*) EXPERIMENTALMENTE
DESAFIADOS COM A BACTÉRIA *Vibrio harveyi* / Nicolas
Argenta da Conceição ; orientador, Rafael Diego da
Rosa, 2018.
66 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Imunidade intestinal.
3. Peptídeos antimicrobianos. 4. Desafio bacteriano.
5. Expressão gênica. I. Diego da Rosa, Rafael. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. III. Título.

Nicolas Argenta da Conceição

ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL DE CRUSTINAS EM
CAMARÕES (*Litopenaeus vannamei*) EXPERIMENTALMENTE
DESAFIADOS COM A BACTÉRIA *Vibrio harveyi*

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para
obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado em
sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 2 de Julho de 2018

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. André de Avila Ramos
Universidade Federal de Santa Catarina

Msc^a. Mariana Rangel Pilotto
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Dr. Rafael da Rosa por toda sua dedicação durante essa trajetória. Sei que jamais conseguiria crescer profissionalmente se não fosse pelas oportunidades que você proporcionou para mim. Também gostaria de agradecer a todos os sermões que teve que dar em mim, sei que não o fez porque quis, mas sim porque precisou para me fortalecer, em especial nos pontos que mais deixo a desejar, e, sinceramente, você conseguiu! Você foi um orientador que sempre se dispôs a responder todas as dúvidas e me apoiou durante os momentos difíceis dessa trajetória, francamente, você foi o melhor orientador que eu poderia ter nesses últimos dois anos!

À professora Dra. Luciane por ensinar que as vezes devemos agir com firmeza para conseguir o que precisamos. Você sempre esteve interessada em saber sobre o meu trabalho e, em especial, como eu estava. Assim como o Rafael, você depositou uma confiança incrível para que eu pudesse assumir responsabilidades que a maior parte dos alunos de IC não assumem e isso me deixou muito feliz!

Ao PIBIC/CNPq pela bolsa de iniciação científica e, juntamente à CAPES, pelo financiamento do projeto.

Gostaria de agradecer aos antigos e atuais companheiros de laboratório, em especial ao Gabriel, Cairé, Mari, Natan, Anderson, Lara, Leonardo, Iago e André. Vocês foram aqueles que sempre me ajudaram quando eu precisei de ajuda, no laboratório ou fora dele. Obrigado aos que disponibilizaram tanto tempo e dedicação para me ensinar a ser um profissional e, em especial, uma pessoa melhor. Sempre que eu me senti triste ou de mau-humor, vocês conseguiram colocar um sorriso no meu rosto. Adorei construir essa amizade com vocês e obrigado por responderem minhas dúvidas à meia noite!

É claro que não poderia deixar de agradecer aos novos integrantes do LIAA. Gustavo, Talita, Luiz e Nayara, ainda estamos nos conhecendo, mas já sei que vocês são pessoas incríveis! Espero que criemos laços de amizade tão fortes quanto eu tenho com o resto do pessoal.

Ao pessoal do LACERT, em especial ao Gabriel, Maiara e Alessandra. Adorei passar as tardes tomando café com vocês enquanto conversávamos e ríamos sobre a vida.

Também gostaria de agradecer aos meus colegas de curso, em especial ao João Barros, Karen, Pâmela, Luisa, Bruno e Débora. Adorei passar o tempo livre com vocês, a companhia de vocês é excepcional!

Aos professores responsáveis pela minha formação durante o curso. A forma de ensinamento de vocês me deixou ainda mais fascinado e curioso sobre a biologia.

À Mari, André Ramos, Rafael e Ricardo por disponibilizarem tempo e dedicação para avaliar este trabalho. Optei em escolhê-los pois sinto apreço e/ou respeito por vocês de diferentes formas. Obrigado por contribuírem com a minha formação.

Elisa, não sei como descrever tudo o que sinto por você e nem por onde começar. Você foi a pessoa que mais me apoiou quando eu precisei e também foi aquela que me aturou durante os momentos mais tristes e difíceis dessa trajetória. Você também foi a pessoa que mais me fez feliz nesses últimos anos, obrigado pelo companheirismo, carinho e auxílio. Posso dizer que nada disso seria possível sem você e que você me completa. Eu te amo!

Também gostaria de agradecer aos meus familiares. Luís, Ícaro, Emanuelle, Pedro e Athos, apesar de serem meus primos, vocês são como irmãos para mim e não é por acaso que nossos pais falam que somos tão parecidos, nós convivemos muito nos últimos anos e eu me espelhei muito em vocês durante a vida, especialmente em Luís por possuir a mesma idade que eu, obrigado por tudo.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus pais. Mãe, pai, vocês me apoiaram de todas as formas possíveis para que eu chegasse aonde cheguei. Eu sei que vocês sempre tentam aliviar as minhas obrigações e que evitam de contar seus problemas pessoais para que eu não me preocupe e possa focar nos estudos. Vocês são os melhores pais que um filho poderia ter e eu os tenho como referência na vida. Eu amo vocês!

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são importantes efetores do sistema imune inato que podem atuar de forma direta contra diferentes classes de microrganismos, como bactérias, fungos, protozoários e vírus. Dos quatro AMPs descritos em camarões peneídeos, a família das crustinas se destaca por sua alta diversidade molecular, transcricional e funcional. A expressão dos quatro membros dessa família (Tipos I a IV) foi inicialmente observada nos hemócitos (células do sistema imune) e, até o momento, pouco se conhece a respeito da expressão desses genes em órgãos constantemente expostos ao ambiente, como o intestino. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil transcricional de crustinas nos hemócitos e no intestino de camarões (*Litopenaeus vannamei*) desafiados ou não com a bactéria patogênica *Vibrio harveyi*. As análises de expressão gênica das seis crustinas de *L. vannamei* (Tipo I: Carcinin *Lv1* e Carcinin *Lv2*, Tipo II: Crustin *Lv* e Crustin-like *Lv*, Tipo III: *LvSWD* e Tipo IV: *LvDWD*) foram realizadas pela técnica de RT-qPCR em amostras de hemócitos e intestino coletadas após 12 h do desafio bacteriano (método de imersão). Enquanto que as crustinas do Tipo I (Carcinin *Lv1* e Carcinin *Lv2*) mostraram-se majoritariamente expressas no intestino, os demais Tipos de crustinas foram mais expressos nos hemócitos. Os níveis basais de expressão de Crustin *Lv* (Tipo II), *LvSWD* (Tipo III) e *LvDWD* (Tipo IV) foram, respectivamente, 78, 52 e 74 vezes maiores nos hemócitos em relação ao intestino. Enquanto que a expressão do gene Crustin *Lv* aumentou 2,4× no intestino após 12 h do desafio com *V. harveyi*, os níveis transcacionais das demais crustinas não foram modulados em nenhum dos dois órgãos analisados frente ao desafio bacteriano. Em conclusão, as crustinas de *L. vannamei* apresentam níveis distintos de expressão gênica basal nos hemócitos e no intestino e são diferencialmente moduladas frente a desafios bacterianos.

Palavras-chave: imunidade intestinal, peptídeos antimicrobianos, desafio bacteriano, expressão gênica.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are important effectors of the innate immune system that can act directly against different groups of microorganisms, such as bacteria, fungi, protozoans and viruses. Among the four AMPs described in penaeid shrimp, the crustin family is notable for its high level of molecular, transcriptional and functional diversity. The expression of the four members of this family (Types I to IV) was initially observed in the hemocytes (immune cells) and, until now, little is known about the expression of these genes in organs constantly exposed to the environment, such as the gut. Therefore, the aim of this study was to characterize the transcriptional profile of crustins in the hemocytes and in the gut of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged or not with the pathogenic bacterium *Vibrio harveyi*. The gene expression analysis of the six *L. vannamei* crustins (Type I: Carcinin *Lv*1 and Carcinin *Lv*2, Type II: Crustin *Lv* and Crustin-like *Lv*, Type III: *Lv*SWD and Type IV: *Lv*DWD) was performed by RT-qPCR using hemocyte and gut samples collected at 12 h after the bacterial challenge (immersion method of challenge). Whereas Type I crustins (Carcinin *Lv*1 and Carcinin *Lv*2) were mainly expressed in the gut, the other crustin Types showed to be more expressed in the hemocytes. The basal expression levels of Crustin *Lv* (Type II), *Lv*SWD (Type III) and *Lv*DWD (Type IV) were, respectively, 78-, 52- and 74-fold higher in hemocytes than in gut. While the gene expression of Crustin *Lv* increased 2,4 fold-change in gut at 12 h after the challenge with *V. harveyi*, the transcriptional levels of the others crustins were not modulated in the analyzed organs following the bacterial challenge. In conclusion, the crustins from *L. vannamei* display a distinct pattern of basal gene expression in hemocytes and gut and are differentially modulated in response to bacterial challenges.

Keywords: gut immunity, antimicrobial peptides, bacterial challenge, gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo demonstrando diferentes mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos (AMPs).

Figura 2. Representação esquemática da estrutura primária dos quatro Tipos de crustinas descritos em crustáceos (Tipos I a IV).

Figura 3. Representação esquemática do camarão *Litopenaeus vannamei* mostrando a posição anatômica do sistema circulatório e do intestino.

Figura 4. Análises para a escolha da melhor condição referência para os cálculos de expressão relativa.

Figura 5. Curvas de dissociação (*melting curves*) dos produtos amplificados por RT-qPCR.

Figura 6. Comparação dos níveis de expressão gênica basal das crustinas Crustin *Lv* (Tipo IIa), *LvSWD* (Tipo III) e *LvDWD* (Tipo IV) nos hemócitos e no intestino de camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei*.

Figura 7. Perfil transcricional das crustinas Crustin *Lv* (Tipo IIa), Crustin-like *Lv* (Tipo IIb), *LvSWD* (Tipo III) e *LvDWD* (Tipo IV) nos hemócitos circulantes de camarões (*Litopenaeus vannamei*) experimentalmente desafiados com a bactéria *Vibrio harveyi*.

Figura 8. Perfil transcricional das crustinas Carcinin *Lv1* (Tipo I), Carcinin *Lv2* (Tipo I), Crustin *Lv* (Tipo IIa), *LvSWD* (Tipo III) e *LvDWD* (Tipo IV) no intestino de camarões (*Litopenaeus vannamei*) experimentalmente desafiados com a bactéria *Vibrio harveyi*.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequências dos iniciadores utilizados nas análises de expressão gênica.

Quadro 2. Crustinas que apresentaram ou não níveis de expressão gênica quantificáveis nos hemócitos e intestino de *Litopenaeus vannamei*.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-DSC: *four-dissulfide core*

ALF: Fatores anti-lipopolissacarídeos

AMPs: Peptídeos antimicrobianos

APD: *The Antimicrobial Peptide Database*

Cq: Ciclo de quantificação

dNTPs: Deoxinucleotídeos trifosfatados

DWD: Proteínas contendo dois domínios WAP

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

kDa: kilodaltons

MAS: Solução de Alsever modificada

PCR: Reação em cadeia da polimerase

RNAi: RNA de interferência

RT-PCR: Transcrição reversa seguida de PCR.

RT-qPCR: Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real

SLPI: Inibidores de Proteases Secretados por Leucócitos

SWD: Proteínas contendo um domínio WAP

Tm: Temperatura de dissociação

UFC: Unidades formadoras de colônia

WAP: *Whey Acidic Protein*

WSSV: Vírus da Síndrome da Mancha Branca

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	20
1.2. CRUSTINAS	22
2. HIPÓTESE	31
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. OBJETIVO GERAL	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. ANIMAIS.....	33
4.2. DESAFIO BACTERIANO	33
4.3. COLETA DOS TECIDOS.....	33
4.4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR.....	34
4.5. ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. ESCOLHA DA CONDIÇÃO REFERÊNCIA	39
5.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA BASAL DE CRUSTINAS NOS HEMÓCITOS E NO INTESTINO	41
5.3. PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CRUSTINAS NOS HEMÓCITOS APÓS DESAFIO BACTERIANO.....	46
5.4. PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CRUSTINAS NO INTESTINO APÓS DESAFIO BACTERIANO	50
6. PRINCIPAIS RESULTADOS	55
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	55
7.1. CONCLUSÃO	55
7.2. PERSPECTIVAS	55
REFERÊNCIAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de camarões ou carcinicultura é uma atividade mundialmente estabelecida. Além de ser importante no suprimento de proteína de origem animal para a alimentação humana, essa atividade gera inúmeros empregos e movimenta um grande volume de capital em diversos países (FAO, 2016). Entre os camarões peneídeos cultivados no mundo, o camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* se destaca por suas excelentes características zootécnicas, sendo assim a espécie mais cultivada (FAO, 2012). Porém, a intensificação dos sistemas de cultivo associada a fatores estressantes gerados por perturbações ambientais podem comprometer o estado de saúde desses animais, deixando-os mais suscetíveis a doenças. Entre as doenças que se destacam por causarem grandes mortalidades nos cultivos estão aquelas causadas por vírus (em especial a Síndrome da Mancha Branca) e por bactérias Gram-negativas do gênero *Vibrio* (BOONCHUEN et al., 2018). O aparecimento de doenças infecciosas tem gerado grandes prejuízos para a aquicultura mundial, sendo esse um dos principais obstáculos enfrentados pelo setor.

Frente a esses microrganismos causadores de doenças, os camarões possuem eficientes mecanismos de defesa. A cutícula é uma importante barreira física (MARTIN; RUBIN; SWANSON, 2004) que não se limita apenas à porção externa do corpo desses animais. A cutícula também está presente nas porções anterior e posterior do intestino e é trocada a cada muda (GUILLAUME; CECCALDI, 1999). A porção medial, no entanto, não é revestida pela mesma cutícula presente nas outras regiões do intestino, mas sim por uma membrana permeável (membrana peritrófica) que permite a absorção seletiva de nutrientes (MCGAW; CURTIS, 2013; WANG et al., 2012). Por possuir uma maior permeabilidade e uma grande superfície de contato com o meio externo, acredita-se que, assim como ocorre em outros artrópodes (SARAIVA et al., 2016), essa região seja mais suscetível à entrada de agentes infecciosos.

Os ambientes marinhos apresentam uma alta concentração de bactérias (até 10^7 células por mililitro) (MAEDA, 2002) e, por essa razão,

diversos microrganismos patogênicos presentes na água do mar podem invadir e causar doenças nos animais que habitam esses ambientes. Microrganismos como bactérias do gênero *Vibrio* podem ser encontrados em suspensão na água do mar ou associados à matéria orgânica ou inorgânica (CAVALLO; STABILI, 2002). Além disso, os microrganismos desse gênero são patógenos oportunistas que estão naturalmente presentes em diferentes órgãos do camarão como intestinos, brânquias e até mesmo na hemolinfa (WANG; WANG, 2015). Interessantemente, esses microrganismos compõem a microbiota e acredita-se que, assim como ocorre em mamíferos e insetos (BROWN; SADARANGANI; FINLAY, 2013; RAMIREZ et al., 2014), a microbiota natural dos camarões tenha uma grande importância na digestão, absorção de nutrientes e também na prevenção e combate a infecções (DAI et al., 2018). No entanto, em determinadas condições, essas bactérias podem se tornar patogênicas causando infecções severas em camarões imunocomprometidos.

Para combater os patógenos, os camarões contam com um sistema imune do tipo inato, intimamente ligado ao tecido fluido do sistema circulatório, a hemolinfa. É nesse tecido que são transportadas diversas moléculas, incluindo componentes do sistema imunológico (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). As células imunocompetentes da hemolinfa, denominadas hemócitos, são responsáveis pela maior parte das reações de defesa desses animais, como a fagocitose e a produção de moléculas citotóxicas, como os peptídeos antimicrobianos (AMPs).

1.1. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Os peptídeos antimicrobianos ou AMPs (do inglês, *AntiMicrobial Peptides*) são classicamente descritos como moléculas catiônicas e anfipáticas, que possuem entre 15 e 100 resíduos de aminoácidos e conformação e sequência aminoacídica variáveis (ROSA; BARRACCO, 2010). Os AMPs podem apresentar uma atividade direta contra diferentes tipos de microrganismos, como bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, leveduras, fungos filamentosos e, em menor grau, contra

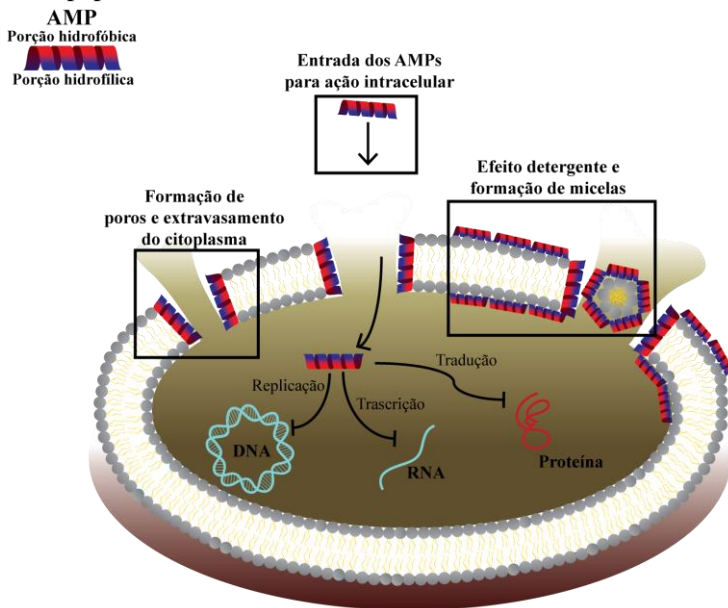
protozoários e vírus envelopados (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004; GUANÍ-GUERRA et al., 2010).

O método de atuação dos AMPs sobre os patógenos é determinado pela sua conformação estrutural, sua carga catiônica e suas propriedades anfipáticas. De forma geral, eles atuam sobre a membrana dos microrganismos. Primeiramente, ocorre uma aproximação eletrostática da região catiônica do AMP com a superfície, geralmente aniônica, dos microrganismos. Após essa interação, a porção hidrofóbica do peptídeo insere-se na bicamada lipídica causando um desequilíbrio da membrana celular. Assim, os AMPs podem ocasionar a formação de poros na membrana plasmática, levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático da célula (**Figura 1**) (BROGDEN, 2005; YOUNT et al., 2006). A interação entre os AMPs e a membrana plasmática é o modo de atuação mais conhecido e descrito, porém estudos recentes mostraram que algumas classes de AMPs podem agir sobre alvos intracelulares, como proteínas, ácidos nucleicos e ainda na síntese dos mesmos (BROGDEN, 2005; HALE; HANCOCK, 2007; NICOLAS, 2009) (**Figura 1**).

Os AMPs são componentes importantes da imunidade inata e estão presentes em todos os Reinos dos seres vivos, desde bactérias até mamíferos (ROSA; BARRACCO, 2010). Os AMPs não possuem uma relação filogenética, sendo moléculas com funções biológicas análogas. Um grande número de AMPs foi identificado e adicionado em bancos de dados especializados, como *The Antimicrobial Peptide Database* ou APD (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) que possui, atualmente, 2.900 sequências depositadas. Em crustáceos, foram identificadas e caracterizadas 15 famílias de AMPs (ROSA; BARRACCO, 2010), das quais seis foram descritas em camarões peneídeos. Dessas, duas famílias são compostas por peptídeos gerados a partir da hidrólise (processamento) de moléculas precursoras (fragmento C-terminal da proteína hemocianina) ou por proteínas que não possuem como função primária a atividade antimicrobiana (histonas) (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2016). As outras quatro famílias são compostas por peptídeos/polipeptídeos codificados por genes: peneidinas (DESTOUMIEUX et al., 1997), fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs)

(GROSS *et al.*, 2001), stylicinas (ROLLAND *et al.*, 2010) e crustinas (BARTLETT *et al.*, 2002).

Figura 1. Esquema ilustrativo demonstrando diferentes mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos (AMPs).



1.2. CRUSTINAS

As crustinas compõem uma diversa família de AMPs rica em resíduos de cisteína. Elas possuem um peptídeo sinal em sua extremidade N-terminal e um domínio WAP (*Whey Acidic Protein*) em sua extremidade C-terminal (SMITH *et al.*, 2008). O domínio WAP é caracterizado pela presença de cerca de 50 resíduos aminoacídicos sendo que oito deles são resíduos conservados de cisteína. Esses oito resíduos de cisteína são ligados entre si por quatro pontes dissulfeto, formando um arranjo tridimensional conhecido como *four-dissulfide core* (4 DSC) (RANGANATHAN *et al.*, 1999). Apesar de o domínio WAP ser característico das crustinas, ele foi originalmente descrito em proteínas

envolvidas na inibição de proteases presentes no soro do leite de mamíferos (HENNIGHAUSEN; SIPPEL, 1982).

O primeiro AMP pertencente à família das crustinas foi descrito em 1999 (RELF et al., 1999). Ele foi isolado dos hemócitos do caranguejo *Carcinus maenas* e foi descrito como um peptídeo antibacteriano de 11,5 kDa (RELF et al., 1999). Em 2002, BARTLETT e colaboradores propuseram o termo “crustina” a essa família de AMPs após identificarem sequências homólogas nos camarões *L. vannamei* e *Litopenaeus setiferus* (BARTLETT et al., 2002). A partir desse trabalho, o termo crustina foi universalmente empregado para essa família de AMPs. Apesar disso, o peptídeo antibacteriano de 11,5 kDa identificado em *C. maenas* foi posteriormente nomeado de “Carcinin” (BROCKTON; HAMMOND; SMITH, 2007). As crustinas estão presentes em diversas espécies de crustáceos e, segundo análises genômicas comparativas, elas também foram identificadas em insetos da Ordem Hymenoptera (ZHANG; ZHU, 2012). Em crustáceos, elas estão divididas em quatro grupos, denominados de Tipos I a IV (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015). Esses Tipos se diferenciam essencialmente em função da presença ou não de determinados domínios entre o peptídeo sinal e o domínio WAP (**Figura 2**).

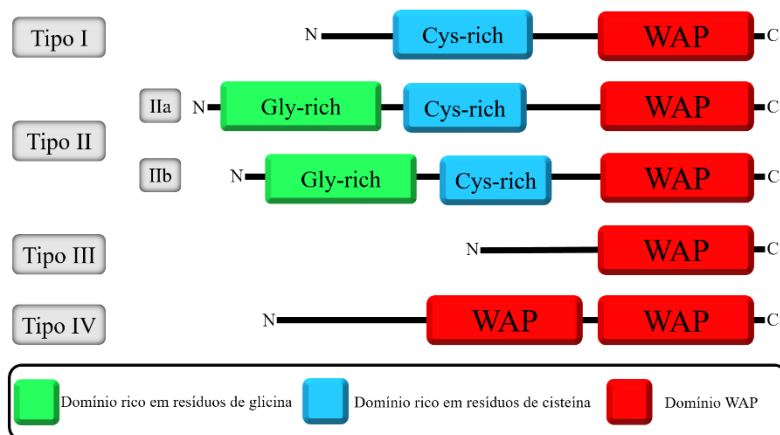
As crustinas do Tipo I são caracterizadas pela presença de um domínio N-terminal rico em resíduos de cisteína (quatro resíduos) e de um único domínio WAP na extremidade C-terminal (**Figura 2**). Integrantes desse Tipo possuem atividade majoritariamente contra bactérias Gram-positivas e são encontrados principalmente em crustáceos da Subordem Pleocyemata, como caranguejos, lagostins e lagostas (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015). Um dos integrantes das crustinas do Tipo I é o peptídeo de 11,5 kDa de *C. maenas* (Carcinin) e, por esse motivo, as crustinas desse Tipo são usualmente chamadas de “Carcininas”. Apenas recentemente, crustinas do Tipo I foram reportadas em camarões peneídeos, como *Penaeus monodon* (DONPUDSA et al., 2014), *Marsupenaeus japonicus* (JIANG et al., 2015; LIU et al., 2014) e *L. vannamei* (BARRETO, 2016).

Em *L. vannamei*, foram identificadas duas crustinas do Tipo I com características estruturais e bioquímicas distintas: Carcinin Lv1 e Carcinin

Lv2. Interessantemente, Carcinin Lv1 é a única crustina com características aniônicas registrada até o momento. A expressão de crustinas do Tipo I foi marcadamente detectada nas brânquias e no trato gastrointestinal de *L. vannamei*, o que sugere a participação desses efetores na imunidade epitelial de camarões (BARRETO, 2016). Em *M. japonicus*, os níveis transcricionais de *MjCrus* I-1 (crustina do Tipo I) no coração, hepatopâncreas, brânquias, estômago e intestino foram maiores em relação aos hemócitos (LIU et al., 2014). Por outro lado, os níveis transcricionais de outras crustinas do Tipo I (*MjCrus* I-2, *MjCrus* I-3 e *MjCrus* I-4) no intestino se mostraram semelhantes aos dos hemócitos (JIANG et al., 2015). Isso demonstra que, em um mesmo Tipo de crustina, os níveis de expressão gênica podem variar de acordo com o sítio de expressão e essas diferenças podem estar relacionadas a funções biológicas distintas. Ademais, LIU e colaboradores (2014) demonstraram que *MjCrus* I-1 estimula a fagocitose de *Vibrio anguillarum* e *Staphylococcus aureus*, além de aglutinar bactérias. Tal constatação sugere que, assim como outros AMPs, o mecanismo de ação das crustinas não se delimita ao modelo de atuação clássico. Na verdade, a expressão gênica de crustinas parece estar relacionada com outras funções biológicas, como a ecdise, regeneração tecidual e estresse fisiológico (SMITH, 2011).

Assim como as crustinas do Tipo I, as crustinas do Tipo II possuem um domínio rico em resíduos de cisteína (quatro resíduos). Porém, as crustinas do Tipo II também apresentam um domínio N-terminal hidrofóbico rico em resíduos de glicina (22-167 resíduos de aminoácidos) localizado antes do domínio rico em resíduos de cisteína (**Figura 2**). As crustinas desse Tipo possuem atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015) e, até o presente momento, foram descritas em camarões peneídeos, no caranguejo real *Paralithodes camtschaticus* (SPERSTAD et al., 2009) e no lagostim *Pacifastacus leniusculus* (JIRAVANICHPAISAL et al., 2007). As crustinas do Tipo II estão divididas em dois subtipos de acordo com assinaturas aminoacídicas específicas: Tipo IIa (Crustin) e Tipo IIb (Crustin-like) (BARRETO et al., 2018).

Figura 2. Representação esquemática da estrutura primária dos quatro Tipos de crustinas descritos em crustáceos (Tipos I a IV).



Em *L. vannamei*, crustinas do Tipo IIa (Crustin *Lv*) foram reportadas por BARTLETT e colaboradores (2002). A importância de Crustin *Lv* nas respostas antimicrobianas de defesa foi investigada *in vivo* pela técnica de RNA de interferência (RNAi). O silenciamento gênico pós-transcricional de Crustin *Lv* resultou no aumento das taxas de mortalidade de camarões da espécie *L. vannamei* quando infectados pela bactéria Gram-negativa *Vibrio penaeicida* (SHOCKEY et al., 2009). SHOCKEY e colaboradores (2009) também analisaram a importância de Crustin *Lv* nas respostas antimicrobianas de defesa após infecção pelo fungo *Fusarium oxysporum*. No entanto, o silenciamento de Crustin *Lv* não alterou significativamente as taxas de mortalidade frente a infecções fúngicas. A expressão gênica de Crustin *Lv* foi analisada nos hemócitos e intestino médio de animais após 48 horas de infecção por injeção intramuscular (BARRETO et al., 2018). Foi constatado que, após 48 horas de infecção pela bactéria *V. harveyi* e pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), a expressão de Crustin *Lv* se manteve constante. A expressão gênica de crustinas do Tipo IIa após infecção viral também foi investigada em hemócitos de *P. monodon* (DONPUDSA et al., 2014). Nesse estudo, foi constatado que a expressão gênica de Crustin *Pm4*

aumentou nas primeiras horas após infecção por WSSV, voltando aos níveis basais 24 horas após a infecção. Interessantemente, a expressão gênica de Crustin *Lv* demonstrou variação durante os estágios de desenvolvimento de *L. vannamei*. A presença desses transcritos nos estágios larvais do camarão sugere que os AMPs podem ser essenciais durante os estágios em que a imunidade desses animais não está bem desenvolvida (QUISPE et al., 2016).

Recentemente, crustinas do Tipo IIb (Crustin-like *Lv*) de *L. vannamei* foram identificadas pelo nosso grupo de pesquisa (BARRETO et al., 2018). A expressão gênica de Crustin-like *Lv* foi avaliada nos hemócitos e intestino médio de *L. vannamei* após 48 horas de infecção por injeção intramuscular de *V. harveyi* e WSSV. Nas condições experimentais desse estudo, a expressão do gene Crustin-like *Lv* se manteve constante após as infecções (BARRETO et al., 2018). A expressão gênica de crustinas do Tipo IIb também foi investigada em outros camarões peneídeos. Em *M. japonicus*, a infecção por *Vibrio alginolyticus* ou por WSSV resultou no aumento dos níveis transcricionais de Crustin-like *Mj* (SUN; WANG; ZHU, 2017). Além disso, a expressão gênica de Crustin-like *Pm* aumentou nos hemócitos de *P. monodon* 24 horas após infecção por injeção intramuscular de *V. harveyi* (AMPARYUP et al., 2008). O aumento da expressão desses genes sugere que, assim como as crustinas do Tipo IIa, as crustinas do Tipo IIb também estão envolvidas nas respostas imunológicas dos camarões contra bactérias. Na verdade, as crustinas recombinantes Crustin-like *Fc* (do camarão *Fenneropenaeus chinensis*) e Crustin-like *Pm* (do camarão *P. monodon*) apresentaram atividade *in vitro* contra *V. alginolyticus* e *V. harveyi*, respectivamente, salientando a provável importância *in vivo* das crustinas do Tipo IIb contra essas bactérias (AMPARYUP et al., 2008; ZHANG et al., 2007). A atividade *in vivo* de Crustin-like *Mj* foi analisada pela técnica de RNAi. O silenciamento pós-transcricional desse gene resultou no aumento das taxas de mortalidade dos animais após infecção viral (SUN; WANG; ZHU, 2017). Interessantemente, a expressão gênica de Crustin-like *Mj* demonstrou-se superior nas brânquias em relação aos hemócitos (SUN; WANG; ZHU, 2017).

Diferente dos Tipos anteriores, as crustinas do Tipo III não possuem domínios na região N-terminal. Na verdade, esse Tipo é caracterizado por possuir apenas um domínio WAP (**Figura 2**). Crustinas desse Tipo são conhecidas como “proteínas contendo domínio WAP” (*Single WAP domain-containing proteins* ou SWD) e foram descritas em camarões peneídeos e no lagostim *Procambarus clarkii* (AMPARYUP; DONPUDSA; TASSANAKAJON, 2008; DU *et al.*, 2010). Esse Tipo apresenta tanto atividade antimicrobiana quanto atividade antiproteolítica (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015). A crustina LvSWD de *L. vannamei* mostrou atividade *in vitro* contra uma cepa de *Vibrio parahaemolyticus* responsável pela doença da necrose hepatopancreática aguda (*Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* ou AHPND) (VISETNAN *et al.*, 2017), sendo essa uma doença responsável por grandes perdas econômicas na carcinicultura (TRAN *et al.*, 2013). Apesar da ausência de estudos *in vivo* que demonstrem a importância de crustinas do Tipo III para a sobrevivência dos animais, foi constatada a modulação gênica desse grupo de crustinas após infecções. O número de transcritos de MjSWD aumentou no intestino anterior e nas brânquias de *M. japonicus* após 12 e 24 horas de infecção por *V. anguillarum* (JIANG *et al.*, 2013). Além disso, ocorreu um aumento no número de transcritos de uma isoforma de LvSWD em hemócitos circulantes após 12, 24 e 48 horas de infecção por *V. anguillarum* (DU; YUAN; REN, 2015).

Finalmente, as crustinas do Tipo IV apresentam dois domínios WAP (*Double WAP domain-containing proteins* ou DWD) e, assim como as crustinas do Tipo III, elas também possuem atividade antiproteolítica (**Figura 2**) (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015). Elas foram inicialmente descritas em *L. vannamei* e denominadas proteínas similares aos inibidores de proteases secretados por leucócitos humanos (*Secretory leukocyte proteinase inhibitor-like protein* ou SLPI-like) (JIMÉNEZ-VEGA; VARGAS-ALBORES, 2007). Esse Tipo de crustina também está presente em *M. japonicus* (CHEN; HE; XU, 2008), *F. chinensis* (DU *et al.*, 2009), caranguejos (LI *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013) e no lagostim *P. clarkii* (ZHANG *et al.*, 2017). A importância *in vivo* de crustinas do Tipo IV foi investigada em *P. clarkii* pela técnica de RNAi. O silenciamento pós-transcricional de PcDWD resultou no

aumento da mortalidade dos animais 8 dias após infecção por *V. anguillarum*, *S. aureus* e WSSV (ZHANG et al., 2017). Além disso, foi demonstrado o aumento do número de transcritos desse gene nos hemócitos, brânquias e no intestino dos animais infectados. Em *L. vannamei*, a modulação de crustinas do Tipo IV também foi observada (BARRETO, 2016; JIMÉNEZ-VEGA; VARGAS-ALBORES, 2007). Os níveis transcricionais de *LvDWD* sofreram variações em animais experimentalmente infectados com bactérias do gênero *Vibrio*. Foi observado um aumento da expressão de *LvDWD* nas horas iniciais da infecção, seguido de um decréscimo na quantidade de transcritos. A presença e modulação desse gene em *L. vannamei* sugere que, assim como ocorre em *P. clarkii*, *LvDWD* possui importância nas respostas imunológicas desses animais frente a infecções.

Assim como ocorre na mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster* (TZOU et al., 2000), acredita-se na possibilidade de células epiteliais, como as presentes no trato gastrointestinal, estarem envolvidas na imunidade epitelial de camarões pela produção e liberação de AMPs para controlar o crescimento das bactérias comensais e patogênicas presentes no intestino. Em trabalhos anteriores, camarões das espécies *P. monodon* (SOONTHORNCHAI et al., 2010) e *L. vannamei* (SILVEIRA et al., 2018) experimentalmente infectados com *V. harveyi* apresentaram modulação da expressão gênica de AMPs em porções específicas do sistema gastrointestinal. Tais observações sugerem que, independentemente do local de produção dos AMPs (hemócitos ou intestino), esses efetores também estão relacionados com a imunidade intestinal de camarões.

A maior parte do conhecimento acerca das respostas imunológicas de camarões penéideos frente a patógenos advém de infecções experimentais realizadas pelo método de injeção. Esse método de infecção possui determinadas vantagens, como o controle mais preciso da concentração de microrganismos injetados. Porém, esse método também possui desvantagens, pois o estresse causado pela inserção da agulha no animal pode alterar alguns parâmetros imunológicos. Por exemplo, a expressão gênica de efetores do sistema imune (como as crustinas) também pode ser modulada por esse método de infecção experimental. A

expressão gênica de Carcinin *Lv1* (Tipo I) no intestino médio de *L. vannamei* aumentou cerca de 50 vezes após 48 horas da lesão tissular (BARRETO, 2016). Finalmente, esse método experimental não mimetiza a rota de infecção natural, não sendo, em grande parte dos casos, o método mais apropriado para análises da expressão gênica de efetores imunológicos.

Uma das alternativas para esse método experimental seria um desafio por imersão. Esse método consiste na imersão dos animais em água do mar contendo microrganismos de interesse em concentrações controladas, evitando injúrias causadas pela inserção de agulhas no corpo do animal e mimetizando, assim, uma infecção natural (SOONTHORNCHAI et al., 2010). Levando esses fatores em consideração, este trabalho teve como interesse avaliar a expressão gênica das crustinas nos hemócitos e intestino de camarões nas primeiras horas de um desafio natural com bactérias patogênicas do gênero *Vibrio*.

2. HIPÓTESE

As crustinas do camarão *L. vannamei* apresentam níveis distintos de expressão gênica basal nos hemócitos e no intestino e são moduladas após um desafio bacteriano.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil transcricional de crustinas nos hemócitos e no intestino do camarão *Litopenaeus vannamei* frente a um desafio com a bactéria patogênica *Vibrio harveyi*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar e comparar os níveis de expressão gênica basal dos diferentes Tipos de crustinas nos hemócitos e no intestino de animais juvenis sadios.
- Caracterizar o perfil transcricional de crustinas nos hemócitos e no intestino de animais desafiados pelo método de imersão com a bactéria *V. harveyi*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camarões juvenis da espécie *L. vannamei* (10 ± 1 g), os quais foram cedidos pelo Laboratório de Camarões Marinhos do Departamento de Aquicultura (UFSC/CCA/LCM). Os animais foram aclimatados no Setor de Aquários do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/LIAA) durante sete dias em aquários contendo aproximadamente 100 L de água salgada, com aeração constante e renovação diária da água de 50%. A temperatura da água foi mantida a 26°C e os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (Guabi; POTIMAR 35 EXT).

4.2. DESAFIO BACTERIANO

O desafio imunológico foi realizado pelo método de imersão utilizando-se a bactéria Gram-negativa marinha *V. harveyi* ATCC 14126. A cultura de *V. harveyi* foi preparada em meio LB-NaCl (1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 3% NaCl, pH 7,2) e incubada a 20°C durante 12 horas sob agitação. Após esse período, a cultura foi centrifugada a $1.000 \times g$ por 10 min e suspensa em água do mar filtrada. A densidade óptica (DO_{600nm}) da suspensão bacteriana foi ajustada para uma concentração correspondente a $\sim 5 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL ($DO_{600nm}=4$). A solução bacteriana foi então inoculada em três tanques contendo 10 L de água do mar filtrada (concentração bacteriana $\sim 2 \times 10^6$ UFC/mL por tanque). Em cada tanque foram dispostos quatro animais que permaneceram imersos na solução bacteriana por 12 horas. Como controle, foram utilizados 12 camarões ($n=4$ animais por tanque) imersos em tanques contendo 10 L de água do mar filtrada.

4.3. COLETA DOS TECIDOS

Transcorridas 12 horas do início do experimento, os animais tiveram os hemócitos e intestinos coletados (**Figura 3**). Para obtenção dos

hemócitos, a hemolinfa foi extraída pela porção ventral do abdome através da inserção de uma agulha (13×0,4 mm) acoplada a uma seringa estéril de 1 mL. A hemolinfa foi coletada na presença de solução anticoagulante (Solução de Alsever Modificada ou MAS: 115 mM glicose, 336 mM NaCl, 27 mM citrato de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,2) (1:2; hemolinfa:MAS) e separada em 3 *pools* de 4 animais por condição. Após centrifugação (1.500 ×g por 10 min a 4°C), o precipitado celular obtido (hemócitos) foi suspenso em 1 mL de TRIzol (Thermo Scientific) e conservado a -20°C para extração de RNA total. Após a extração da hemolinfa, os camarões foram anestesiados (banho de gelo por 10 min) e sacrificados. Os intestinos (porção medial e posterior) foram coletados com auxílio de bisturi, lavados em solução Tris-NaCl (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7,4), separados em 3 *pools* de 4 animais por condição, macerados na presença de 1 mL TRIzol (Thermo Scientific) e conservados a -20°C para a extração de RNA total.

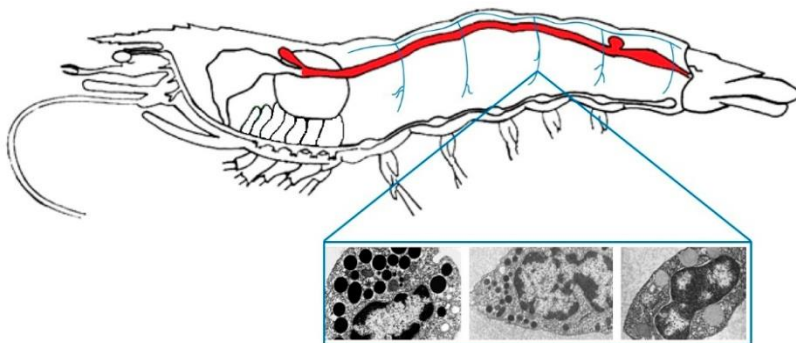
4.4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR

As amostras conservadas em TRIzol (Thermo Scientific) foram descongeladas à temperatura ambiente e submetidas à extração com clorofórmio. Após centrifugação (12.000 ×g por 15 minutos a 4°C), a fase líquida contendo o RNA total foi transferida para um novo microtubo. O RNA total foi precipitado com isopropanol, lavado com álcool 75% e suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases. Após esse processo, as amostras foram incubadas com a enzima DNase I (Thermo Scientific; 1 U/μL) por 30 min a 37°C. Em seguida, a enzima foi inativada a 65°C por 10 min na presença de 4,5 mM EDTA e as amostras de RNA precipitadas com 0,3 M acetato de sódio (pH 5,5) e isopropanol (1:1; v:v). A quantificação do RNA total foi realizada por espectrofotometria (NanoVue Plus), considerando a relação $A_{260:280}$ como indicativo da pureza do RNA obtido. Além disso, a integridade das amostras foi confirmada em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio.

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada pela transcrição reversa de 0,5 μg de RNA total das amostras utilizando 200 U

da enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific), 0,5 mM de dNTP Mix, 20 U da enzima RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific) e 0,5 µg de oligo(dT)₁₂₋₁₈. As amostras foram incubadas a 42°C por 60 min e a enzima inativada a 65°C por 15 min.

Figura 3. Representação esquemática do camarão *Litopenaeus vannamei* mostrando a posição anatômica do sistema circulatório e do intestino.



Os órgãos/tecidos estão representados por cores: porção medial e posterior do intestino (vermelho) e parte do sistema circulatório (azul). Os hemócitos estão representados no retângulo (da esquerda para a direita: hemócitos granulares, hemócitos semi-granulares e hemócitos hialinos). Adaptado de (FALCHETTI, 2016; GARGIONI; BARRACCO, 1998).

4.5. ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA

4.5.1. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

As reações de transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas no sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Thermo Scientific). As reações foram executadas em um volume final de 15 µL (em duplicatas) na presença de 1 µL de cDNA (diluído 20 vezes), 0,2 µM de cada iniciador (senso e antissenso) e 7,5 µL Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2× (Thermo Scientific). As sequências dos iniciadores utilizados estão apresentadas no **Quadro 1**. Para a amplificação, foram utilizadas as seguintes condições:

desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e hibridização/extensão a 60°C por 1 min.

Quadro 1. Sequências dos iniciadores utilizados nas análises de expressão gênica.

Gene	Sequência dos iniciadores (5'-3')	GenBank	Eficiência	Referências
Genes de referência				
<i>Lv</i> EF1 α (Elongation factor 1-alpha)	S: TGGCTGTGAACAAGATGGACA AS: TTGTAGCCACCTTCTTGACG	GU136229	97,2%	DE LA VEGA et al., 2008
<i>Lv</i> RpS6 (40S ribosomal protein S6)	S: AGCAGATACCCTTGGTGAAG AS: GATGCAACCACGACTGAC	FE080516	98,8%	GONCALVES et al., 2014
<i>Lv</i> RpS3A (S3A ribosomal protein)	S: GGCTTGCTATGGTGTGCTCC AS: TCATGCTCTTGGCTCGCTG	BF023924	97,4%	DE LA VEGA et al., 2008
<i>Lv</i> Actin (β -actin)	S: CCAGGAGACCCTACAAC AS: AGCGAGGGCAGTGATTTC	AF300705	98,3%	WANG et al., 2007
Crustinas				
Carcinin <i>Lv</i> 1 (Tipo I)	S: CCTCCCGTTGAAGATCACAG AS: ATGATGGTCCAAGCAGGTGTC	FE175664	100,5%	BARRETO, 2016
Carcinin <i>Lv</i> 2 (Tipo I)	S: CTGTTAAGATCCTTGAGCCG AS: CCCCTCTCACGTGTTTCAATAA	FE099583	118%	BARRETO, 2016
Crustin <i>Lv</i> (Tipo IIa)	S: CGAACCAGAGACACCTGTTG AS: CAGCACACTTGTAGTCGTTG	AY488496	78,4%	GONCALVES et al., 2014
Crustin-like <i>Lv</i> (Tipo IIb)	S: GCAGGATAAAGACAAGGC AS: GTAATTGCAGTTGAATCCGCC	JQ824114	87,7%	BARRETO et al., 2018
<i>Lv</i> SWD (Tipo III)	S: GTCATCACGGAGAGGAACTG AS: CTTCCGTTTCCGTAAGGAGG	AY465833	96,1%	BARRETO, 2016
<i>Lv</i> SLPI (Tipo IV)	S: TGCATCCACTACCACCACTC AS: TCTCGCTTAGCCTTCCTTG	EF467169	95,8%	BARRETO, 2016

S: iniciador senso; AS: iniciador antissenso

4.5.2. AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE E EFICIÊNCIA DOS INICIADORES

Para confirmar a especificidade dos iniciadores, foram realizadas análises de curvas de dissociação (60-95°C; 0,3°C/s) após as etapas de amplificação. A presença de um único pico (determinado pelo máximo valor da curva de primeira derivada dos dados emitidos de fluorescência) foi utilizada como critério para a especificidade dos pares de iniciadores. A eficiência dos iniciadores foi avaliada a partir da amplificação das sequências de interesse utilizando-se diluições seriadas de amostras de cDNA de diferentes tecidos. Os valores de C_q (ciclo de quantificação) de cada diluição foram utilizados para a construção de uma curva linear, cujo valor de *slope* (coeficiente angular da reta) foi utilizado para o cálculo da eficiência (E) segundo a fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$.

4.5.3. SELEÇÃO DOS GENES DE REFERÊNCIA

Para a escolha da melhor condição referência, foi avaliada a expressão de quatro genes candidatos: do fator de alongação 1 α (*LvEF1 α* ; GenBank: GU136229), das proteínas ribossomais *LvRpS6* (GenBank: FE080516) e *LvRpS3A* (GenBank: BF023924) e da β -actina (*LvActin*; GenBank: AF300705). A melhor condição referência foi determinada pelo programa RefFinder (<http://150.216.56.64/referencegene.php?type=reference>). Esse programa leva em consideração a variação dos valores de Cq entre as amostras para determinar qual(is) é(são) o(s) gene(s) com expressão mais estável. A expressão gênica dos candidatos foi avaliada de forma individual e, para uma análise mais apurada, também foi considerada a média geométrica dos valores de Cq de suas diferentes combinações (VANDESOMPELE et al., 2002).

4.5.4. CÁLCULO DE EXPRESSÃO RELATIVA E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A primeira normalização (ΔCq) foi realizada para as análises de distribuição da expressão gênica e para as análises de expressão gênica frente ao desafio bacteriano. Essa normalização (ΔCq) foi realizada através da subtração dos valores de Cq dos genes de interesse pelos valores de Cq da melhor condição referência. Para as análises da distribuição da expressão gênica, a segunda normalização ($\Delta\Delta Cq$) foi realizada utilizando-se como condição calibradora a média aritmética dos valores de ΔCq dos hemócitos circulantes. Para as análises de expressão gênica frente ao desafio bacteriano, a segunda normalização ($\Delta\Delta Cq$) foi realizada utilizando-se como condição calibradora a média aritmética dos valores de ΔCq do grupo de camarões não desafiados (Grupo Controle). O cálculo de expressão relativa foi realizado utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A construção dos gráficos foi realizada no programa GraphPad Prism 7. Os dados de RT-qPCR foram submetidos ao teste t não-pareado e a variação entre os valores foi considerada significativa quando

observada uma diferença de expressão relativa maior que 2 vezes (*fold-change*) e $P < 0,05$. As análises e a nomenclatura utilizadas neste trabalho foram baseadas nas recomendações do MIQE *guidelines* (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN et al., 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ESCOLHA DA CONDIÇÃO REFERÊNCIA

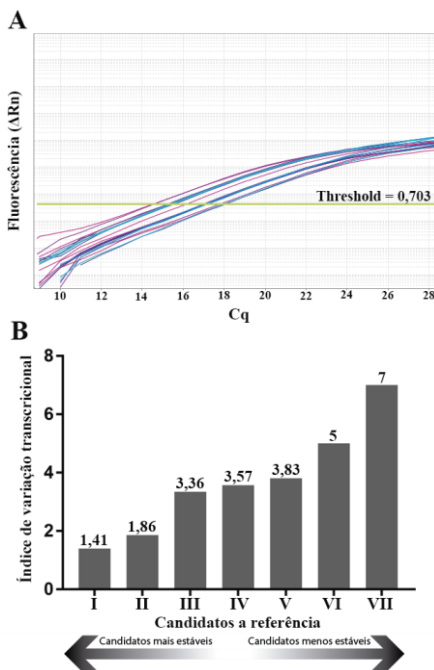
No presente estudo, o perfil transcricional das crustinas de *L. vannamei* foi analisado em dois importantes tecidos/órgãos associados à imunidade de camarões: os hemócitos (células imunocompetentes) e o intestino (potencial via de entrada de microrganismos invasores). Especificamente, foram analisadas as duas crustinas do Tipo I (Carcinin *Lv1* e Carcinin *Lv2*) (BARRETO, 2016), a crustina do Tipo IIa (Crustin *Lv*) (BARTLETT et al., 2002) e a do Tipo IIb (Crustin-like *Lv*) (BARRETO et al., 2018) e as crustinas do Tipo III (*LvSWD: Single WAP Domain-containing proteins*) (JIMÉNEZ-VEGA et al., 2004) e do Tipo IV (*LvDWD: Double WAP Domain-containing proteins*) (JIMÉNEZ-VEGA; VARGAS-ALBORES, 2007).

Para normalizar os cálculos de expressão relativa dos genes de interesse (crustinas) nos hemócitos e intestino de camarões sadios e desafiados com *V. harveyi*, foi determinada a melhor condição referência. Para isso, quatro genes candidatos foram selecionados com base em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa: *LvEF1α*, *LvRpS6*, *LvRpS3A* e *LvActin* (BARRETO et al., 2018; COELHO et al., 2016; GONCALVES et al., 2014; SILVEIRA et al., 2018). Primeiramente, foram comparados o perfil das curvas de amplificação e os valores de Cq (ciclo de quantificação) de cada um dos quatro genes candidatos entre todas as amostras biológicas. Dos quatro candidatos analisados, apenas a expressão de *LvActin* não se mostrou estável entre todas as condições experimentais (**Figura 4A**), portanto, esse gene não foi considerado nas análises subsequentes.

O cálculo para a determinação da melhor condição referência foi realizado no programa RefFinder utilizando-se os valores de Cq dos genes *LvEF1α*, *LvRpS6* e *LvRpS3A*. O coeficiente de estabilidade foi calculado com base nos valores de Cq de cada um dos três genes individualmente e na média geométrica das diferentes combinações entre eles: (I) *LvEF1α*, *LvRpS6* e *LvRpS3A*, (II) *LvRpS6* e *LvRPS3A*, (III) *LvEF1α* e *LvRPS6*, (IV) *LvEF1α* e *LvRPS3A*, (V) *LvRPS6*, (VI) *LvEF1α*, (VII) *LvRPS3A*.

Como observado na **Figura 4B**, a condição que apresentou o melhor valor de estabilidade (menor variação de expressão entre as condições experimentais) foi a média geométrica dos três genes candidatos. Esses valores foram utilizados na primeira normalização (ΔCq) dos cálculos de expressão gênica relativa.

Figura 4. Análises para a escolha da melhor condição referência para os cálculos de expressão relativa.



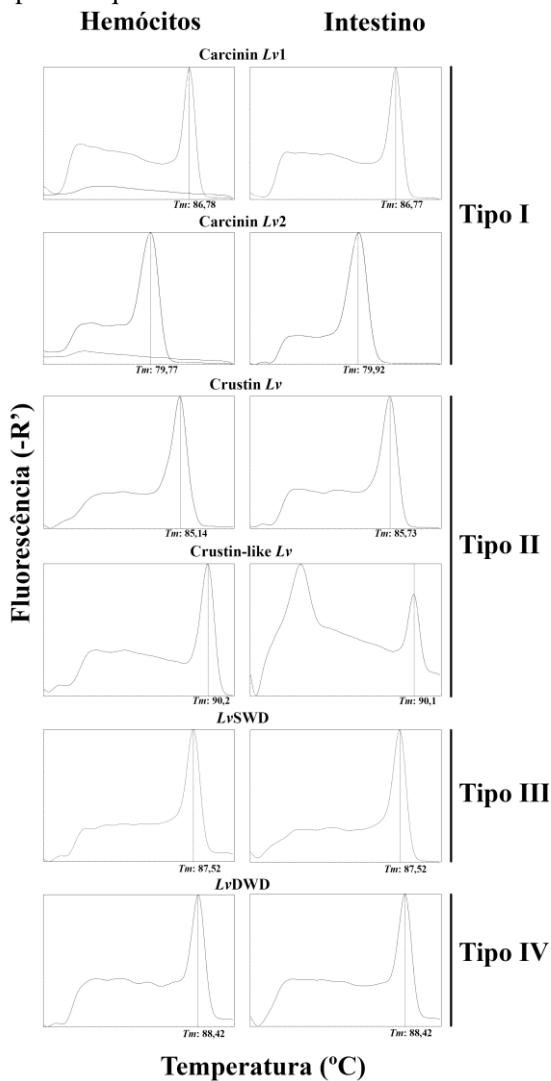
A: Detalhe da fase exponencial da amplificação de *LvActin* demonstrada em escala logarítmica. Cada curva representa a amplificação de uma amostra ao longo dos ciclos de quantificação (Cq). ΔRn representa os valores de Rn descontados da fluorescência basal (*baseline*), sendo Rn a divisão da fluorescência do fluoróforo intercalante de DNA (SYBR Green) pela fluorescência do fluoróforo passivo (ROX) **B:** índice de variação transcripcional dos genes candidatos a referência e da média geométrica de suas combinações: **(I)** *LvEF1 α* , *LvRpS6* e *LvRpS3A*; **(II)** *LvRpS6* e *LvRPS3A*; **(III)** *LvEF1 α* e *LvRpS6*; **(IV)** *LvEF1 α* e *LvRPS3A*; **(V)** *LvRPS6*; **(VI)** *LvEF1 α* ; **(VII)** *LvRPS3A*.

5.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA BASAL DE CRUSTINAS NOS HEMÓCITOS E NO INTESTINO

Primeiramente, os níveis de expressão gênica basal das seis crustinas de *L. vannamei* foram analisados e comparados entre hemócitos e intestino de animais saudáveis. Apesar de a expressão das duas crustinas do Tipo I (Carcinin *Lv1* e Carcinin *Lv2*) ter sido detectada nos dois tecidos (**Figura 5**), os níveis de expressão desses genes foram quantificados apenas no intestino. Nos hemócitos de animais saudáveis, os níveis de expressão de Carcinin *Lv1* e Carcinin *Lv2* ficaram abaixo do limite mínimo de detecção da técnica de RT-qPCR. Desse modo, não foi possível comparar os níveis de expressão basal desses genes entre os dois tecidos de interesse.

Por meio de análises semi-quantitativas de expressão gênica (RT-PCR), BARRETO (2016) mostrou que ambas crustinas do Tipo I são expressas nas brânquias e intestino, tecidos esses que estão em constante contato com o meio externo (BARRETO, 2016). Comparativamente, a expressão gênica de *MjCrus I-1* e *MjCrus I-5* no intestino de *M. japonicus* mostrou-se, respectivamente, 50 e 2 vezes superior em relação aos hemócitos circulantes (JIANG et al., 2015; LIU et al., 2014). No entanto, outras crustinas do Tipo I de *M. japonicus* (*MjCrus I-2* e *MjCrus I-4*) são mais expressas nos hemócitos do que no intestino (JIANG et al., 2015). Enquanto que as crustinas do Tipo I de caranguejos, lagostas e lagostins (Subordem Pleocyemata) são majoritariamente expressas nos hemócitos (SULEIMAN; SMITH; DYRYNDA, 2017), as crustinas do Tipo I de camarões peneídeos (Subordem Dendrobranchiata) parecem ser expressas majoritariamente em tecidos epiteliais (BARRETO, 2016; JIANG et al., 2015; LIU et al., 2014).

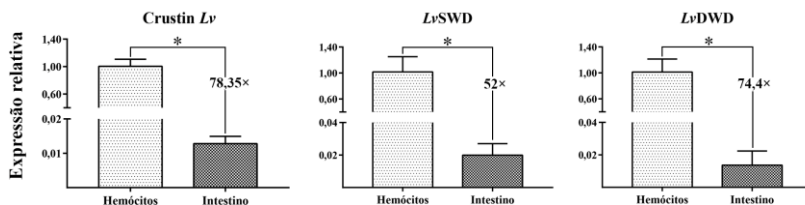
Figura 5. Curvas de dissociação (*melting curves*) dos produtos amplificados por RT-qPCR.



Perfil derivado da curva de dissociação dos produtos das reações de RT-qPCR das crustinas nos hemócitos (primeira coluna) e no intestino (segunda coluna). **Tm**: temperatura de dissociação (*melting temperature*) em graus Celsius (°C). **Fluorescência (-R')**: primeira derivada negativa dos valores de Rn.

Quanto às crustinas do Tipo II, a expressão gênica de Crustin *Lv* foi detectada nos hemócitos e no intestino (**Figura 5**), sendo que a expressão gênica nos hemócitos foi 78,35 vezes ($P = 0,000079$) superior em relação ao intestino (**Figura 6**). Assim como observado neste trabalho, BARRETO e colaboradores (2018) observaram que Crustin *Lv* é majoritariamente expressa nos hemócitos em relação a outros órgãos, como o intestino. A distribuição da expressão gênica de Crustin *Pm4* (crustina do Tipo IIa) apresentou um resultado semelhante, sendo mais expressa nos hemócitos do que em outros órgãos (DONPUDSA et al., 2014).

Figura 6. Comparação dos níveis de expressão gênica basal das crustinas Crustin *Lv* (Tipo IIa), *LvSWD* (Tipo III) e *LvDWD* (Tipo IV) nos hemócitos e no intestino de camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei*.



Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$ pools de 4 animais). *Diferenças estatísticas entre os hemócitos e o intestino (*cutoff* de expressão = 2 vezes; $P < 0,05$) obtidas pelo teste t não-pareado.

Assim como Crustin *Lv*, a expressão do gene Crustin-like *Lv* também foi detectada nos hemócitos. No entanto, nas reações de RT-qPCR com amostras de intestino foram detectados dois picos nas curvas de dissociação, indicando que dois produtos foram amplificados com o mesmo par de iniciadores (**Figura 5**). Esse resultado pode ter ocorrido devido à presença de duas isoformas de Crustin-like *Lv* no intestino, porém, seria necessário realizar o sequenciamento desses produtos para que essa teoria seja confirmada. A distribuição da expressão gênica de Crustin-like *Lv* foi analisada de forma semi-quantitativa em diversos tecidos de *L. vannamei* (BARRETO et al., 2018). Nesse estudo, apesar de

a expressão de Crustin-like *Lv* ser detectada nos hemócitos, ela foi expressa majoritariamente nas brânquias, mas também no intestino (BARRETO et al., 2018).

A expressão gênica da crustina do Tipo III, *LvSWD*, foi detectada em ambos os tecidos, mas ela se mostrou 52 vezes ($P = 0,0018$) mais expressa nos hemócitos do que no intestino (**Figura 6**). Recentemente, a distribuição da expressão gênica de *LvSWD* foi analisada em diferentes tecidos de *L. vannamei*. Assim como observado no presente estudo, a expressão de *LvSWD* foi maior nos hemócitos do que no intestino (VISETNAN et al., 2017). Em *M. japonicus*, a expressão de *MjSWD* foi marcadamente detectada nos hemócitos e não foi detectada no intestino (AMPARYUP; DONPUDSA; TASSANAKAJON, 2008). Porém, outro estudo observou a expressão de *MjSWD* em diversos tecidos, incluindo o intestino. Ademais, nesse estudo a expressão gênica de *MjSWD* foi marcadamente detectada nas brânquias e no estômago (JIANG et al., 2013). Essa divergência entre os estudos de expressão de *MjSWD* pode ser o resultado da detecção de diferentes isoformas ou da eficiência dos iniciadores utilizados. No lagostim *P. clarkii*, a expressão gênica de *PcSWD* foi detectada nos hemócitos, mas principalmente no intestino e no coração (DU et al., 2010).

Por último, apesar de a expressão da crustina do Tipo IV (*LvDWD*) ter sido detectada em ambos os tecidos, sua expressão foi 74,4 vezes ($P = 0,010$) maior nos hemócitos do que no intestino de *L. vannamei* (**Figura 6**). Em *M. japonicus*, a expressão gênica de *MjDWD* foi detectada em diversos órgãos/tecidos, como brânquias, órgão linfoide, hemócitos e intestino (SUTHIANTHONG et al., 2011). De forma semelhante ao observado em *L. vannamei*, a expressão de *PcDWD* de *P. clarkii* foi maior nos hemócitos do que no intestino (ZHANG et al., 2017). Uma constatação semelhante também foi observada no caranguejo *Eriocheir sinensis* (LI et al., 2013).

Atualmente, a expressão gênica de AMPs em camarões é considerada exclusiva de hemócitos, porém, é possível que, assim como ocorre na mosca-da-fruta *D. melanogaster* (TZOU et al., 2000), as células epiteliais expressem esses AMPs para controlar microrganismos comensais e patogênicos. Assim como nos hemócitos que produzem e

armazenam AMPs, as células epiteliais do intestino podem possuir uma função semelhante, produzindo e liberando os AMPs no lúmen intestinal. Neste estudo, a expressão gênica de Carcinin *Lv1* e Carcinin *Lv2* se mostrou maior no intestino em relação aos hemócitos. Essa observação pode ser um indicativo de que esse gene seja transcrito em células epiteliais. Ademais, BARRETO (2016) não constatou a presença desses transcritos nos hemócitos, porém, constatou a presença de transcritos desses genes nas brânquias, estômago, intestino e cordão nervoso (BARRETO, 2016). Tais observações salientam uma possível importância desse gene nas defesas epiteliais de *L. vannamei*. Alternativamente à expressão epitelial, uma vez que o sistema circulatório do camarão é aberto/semiaberto, os hemócitos infiltrados nesse órgão podem estar expressando as crustinas do Tipo I. Isso sugere que, independentemente de qual tipo celular é responsável pela produção desses transcritos, eles são importantes para controlar os microrganismos presentes no intestino.

Neste estudo, transcritos das crustinas do Tipo II, III e IV foram majoritariamente detectados nas células imunocompetentes dos camarões, os hemócitos. Porém, os transcritos desses Tipos de crustinas também foram detectados no intestino sendo esse, possivelmente, um resultado de infiltração hemocitária. Ademais, a expressão gênica de Crustin *Lv* é sabidamente exclusiva dos hemócitos. Na verdade, a infiltração hemocitária é definida como uma das respostas celulares de crustáceos (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Isso sugere que os hemócitos circulantes são recrutados para o intestino afim de controlar os microrganismos ali presentes. Ao encontro dessa ideia, hemócitos infiltrados no intestino médio de *L. vannamei* foram detectados pela técnica de imunohistofluorescência utilizando-se anticorpos contra um AMP exclusivamente expresso nos hemócitos (SILVEIRA et al., 2018). Porém, são necessárias técnicas complementares como hibridização *in situ* e/ou imunofluorescência para se confirmar quais tipos celulares são responsáveis pela produção desses transcritos.

Neste estudo, foi possível detectar transcritos de todos os genes nos hemócitos e intestino, sendo que, enquanto que as crustinas do Tipo I se mostraram mais expressas no intestino, as crustinas do Tipo II, III e IV

foram mais expressas nos hemócitos. Porém, não foi possível quantificar a expressão gênica de Carcinin *Lv*1 e Carcinin *Lv*2 nos hemócitos e de Crustin-like *Lv* no intestino (**Quadro 2**).

Quadro 2. Crustinas que apresentaram ou não níveis de expressão gênica quantificáveis nos hemócitos e intestino de *Litopenaeus vannamei*.

Crustina		Hemócitos	Intestino
Tipo I	Carcinin <i>Lv</i> 1	✗	✓
	Carcinin <i>Lv</i> 2	✗	✓
Tipo II	Crustin <i>Lv</i>	✓	✓
	Crustin-like <i>Lv</i>	✓	✗
Tipo III	<i>Lv</i> SWD	✓	✓
Tipo IV	<i>Lv</i> DWD	✓	✓

5.3. PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CRUSTINAS NOS HEMÓCITOS APÓS DESAFIO BACTERIANO

O perfil de expressão gênica das diferentes crustinas de *L. vannamei* foi posteriormente analisado nos hemócitos e no intestino de animais experimentalmente desafiados com o método de imersão durante 12 horas com a bactéria Gram-negativa *V. harveyi*. Em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, a concentração de hemócitos circulantes de animais desafiados durante 12 horas com *V. harveyi* se mostrou inferior à de animais não desafiados. Essa redução após o desafio pode ter ocorrido devido a migração hemocitária para o intestino com o intuito de controlar os microrganismos provenientes do desafio. Por esse motivo, o desafio bacteriano do presente estudo foi realizado por 12 horas. As respostas imunológicas dos camarões frente a patógenos têm sido estudadas quase exclusivamente por meio de infecções experimentais utilizando métodos

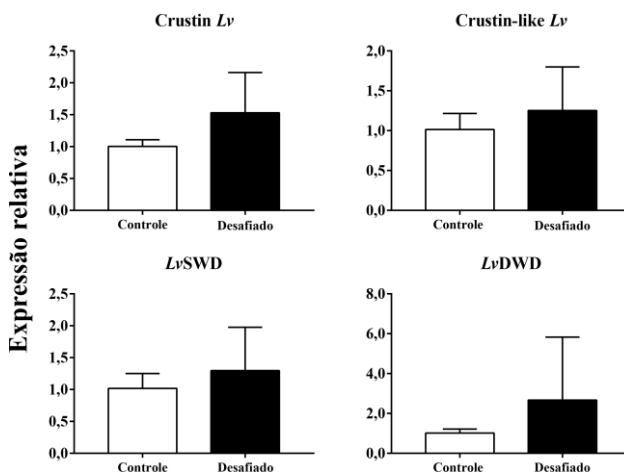
de injeção intramuscular. O principal motivo dessa escolha é o controle preciso da concentração de microrganismos que são administrados nos animais. Porém, esse método ignora algumas barreiras naturais de defesa, como a cutícula, além de causar um estresse pela inserção da agulha que pode alterar alguns parâmetros imunológicos. Por exemplo, a expressão gênica da crustina do Tipo I, Carcinin *Lv1*, aumentou mais de 50 vezes após injeção com água do mar estéril (BARRETO, 2016). Além dessa, a expressão gênica de *EsDWD*, crustina do Tipo IV de *E. sinensis*, sofreu modulação nas primeiras horas após sofrer injúria no tecido (LI et al., 2012). Na verdade, a expressão gênica de crustinas parece estar relacionada com outras funções biológicas, como a regeneração tecidual (SMITH, 2011).

Alternativamente, podem ser utilizados métodos experimentais que mimetizem as rotas naturais de infecção, sendo, de maneira geral, uma forma mais adequada de se estudar as interações patógeno-hospedeiro. Alguns métodos de infecção por microrganismos foram descritos em camarões, como infecção transcuticular, infecção oral, infecção branquial, infecções causadas por ferimentos e também causadas pelo desequilíbrio da microbiota (SAULNIER et al., 2000). Entre os métodos experimentais que mimetizam rotas naturais está o desafio por imersão (SOONTHORNCHAI et al., 2010). Esse método não causa injúrias aos animais e mimetiza de forma mais adequada uma infecção natural. Apesar disso, poucos estudos acerca das defesas imunológicas foram elaborados utilizando-se esse método. Porém, foi constatado que a expressão gênica de AMPs de camarões peneídeos sofre modulação em diferentes tecidos após desafio bacteriano pelo método de imersão (JIANG et al., 2013; SOONTHORNCHAI et al., 2010; VISETNAN et al., 2017).

Os hemócitos são as células imunocompetentes presentes na hemolinfa dos camarões, sendo responsáveis pela maior parte das reações de defesa desses animais (CERENIUS et al., 2010). Até o presente momento, a expressão gênica dos AMPs de camarões peneídeos (peneidinas, crustinas, ALFs e stylicinas) parece ser exclusiva dos hemócitos (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2016). Interessantemente, no presente estudo, a expressão gênica das quatro crustinas expressas em

hemócitos (Crustin *Lv*, Crustin-like *Lv*, *Lv*SWD e *Lv*DWD) não foi modulada nos hemócitos circulantes após o desafio bacteriano pelo método de imersão (**Figura 7**).

Figura 7. Perfil transcricional das crustinas Crustin *Lv* (Tipo IIa), Crustin-like *Lv* (Tipo IIb), *Lv*SWD (Tipo III) e *Lv*DWD (Tipo IV) nos hemócitos circulantes de camarões (*Litopenaeus vannamei*) experimentalmente desafiados com a bactéria *Vibrio harveyi*.



Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. As barras brancas representam os valores médios de expressão relativa do Grupo Controle (camarões não desafiados) enquanto que as barras pretas representam os valores médios de expressão relativa do Grupo Experimental (12 horas após um desafio por imersão com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126).

Assim como observado no presente estudo, a expressão gênica de Crustin *Lv* e Crustin-like *Lv* não foi modulada nos hemócitos após infecção por injeção utilizando-se *V. harveyi* ATCC 14126 (BARRETO et al., 2018). A expressão gênica da crustina do Tipo IIb de *P. monodon*, Crustin-like *Pm*, também não sofreu alteração após 12 horas de infecção intramuscular por *V. harveyi* (AMPARYUP et al., 2008). Semelhantemente, a expressão gênica de *Lv*DWD nos hemócitos não sofreu modulação após 12 horas de infecção por injeção de *V.*

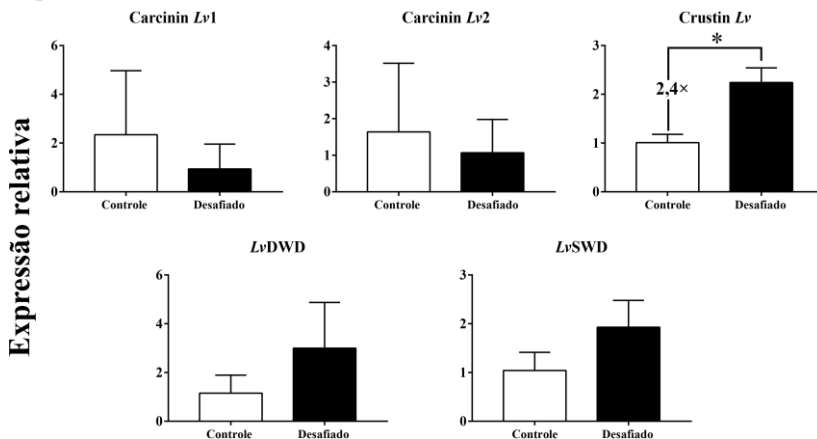
anguillarum (ZHANG et al., 2017). Porém, os hemócitos de *P. monodon* apresentaram um aumento no número de transcritos de Crustin-like *Pm* após 24 horas de infecção (AMPARYUP et al., 2008). Além disso, a expressão gênica de *LvDWD* foi maior nos hemócitos de *L. vannamei* após 48 horas de infecção intramuscular com *V. harveyi* ATCC 14126 (BARRETO, 2016). Nesse sentido, é possível que os AMPs sofram uma alteração das taxas transcricionais nos hemócitos circulantes em períodos diferentes após o desafio por imersão, sendo que isso pode acontecer após a entrada desses patógenos na hemolinfa. Em um estudo elaborado por SOONTHORNCHAI e colaboradores (2010), foi relatada a destruição das células epiteliais do intestino médio e da membrana peritrófica de *P. monodon* por *V. harveyi* após 48 horas de um desafio por imersão. É possível que 12 horas não seja tempo suficiente para que ocorra essa destruição e, consequentemente, não ocorre a entrada da bactéria na hemocele.

A importância dos AMPs no controle da microbiota presente naturalmente na hemolinfa foi demonstrada pelo silenciamento pós-transcricional pelo método de RNAi (PONPRATEEP et al., 2012). O silenciamento de *ALF_{Pm3}* do camarão *P. monodon* resultou no aumento das taxas de mortalidade dos animais sadios devido ao aumento descontrolado da microbiota da hemolinfa (PONPRATEEP et al., 2012). Alternativamente à alteração das taxas transcricionais, assim como ocorre com as peneidinas, as crustinas também podem sofrer modulações pós-transcricionais. É possível que, assim como ocorre com as peneidinas, as crustinas sejam liberadas na hemolinfa em resposta a desafios microbianos (DESTOUMIEUX et al., 2000), uma vez que elas também são produzidas e armazenadas nos hemócitos (ANTONY; BRIGHT SINGH; PHILIP, 2010). Em outras palavras, esses genes parecem ser constitutivamente expressos e, nas condições experimentais deste trabalho, não modulados. Porém, é possível que o desafio bacteriano altere os níveis plasmáticos das crustinas (que estão presentes nos grânulos dos hemócitos) para que, assim como o *ALF_{Pm3}*, ocorra o controle da microbiota presente na hemolinfa.

5.4. PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CRUSTINAS NO INTESTINO APÓS DESAFIO BACTERIANO

Finalmente, foi comparado o perfil transcricional das crustinas expressas no intestino (Carcinin *Lv*1, Carcinin *Lv*2, Crustin *Lv*, *Lv*SWD e *Lv*DWD) entre animais desafiados ou não com a bactéria *V. harveyi*. Como o intestino é uma importante via de entrada de patógenos e um órgão responsável pela produção de efetores do sistema imune (SILVEIRA et al., 2018), estudar o perfil transcricional de AMPs se torna essencial nesse órgão, especialmente em um estudo que apresenta desafio bacteriano por imersão. A expressão gênica de Carcinin *Lv*1, Carcinin *Lv*2, *Lv*SWD e *Lv*DWD não foi modulada no intestino após o desafio bacteriano (**Figura 8**). Porém, a expressão gênica de crustinas pode apresentar modulação em regiões específicas de um mesmo órgão (SOONTHORNCHAI et al., 2010) e, uma vez que o intestino foi analisado inteiro no presente estudo, existe a possibilidade de que uma modulação em função dessas regiões não tenha sido detectada. Diferente das crustinas do Tipo I, III e IV, a expressão do gene Crustin *Lv* (Tipo IIa) apresentou um aumento de 2,4 vezes frente ao desafio bacteriano (**Figura 8**). Além disso, a expressão gênica de crustinas do Tipo IIb de *P. monodon* aumentou após 24 horas de um desafio por imersão com *V. harveyi* (SOONTHORNCHAI et al., 2010). Por outro lado, em outro estudo a expressão gênica de Crustin *Lv* e Crustin-like *Lv* não sofreu modulação no intestino médio após 48 horas de infecção intramuscular por *V. harveyi* (BARRETO, 2016). Essa divergência pode ter ocorrido pela diferença de metodologia experimental empregada nos estudos. É provável que as bactérias não tenham tanta interação com o intestino ao utilizar o método de infecção intramuscular em relação ao desafio por imersão, uma vez que o método por imersão propicia um contato direto entre as bactérias e o trato gastrointestinal dos camarões.

Figura 8. Perfil transcricional das crustinas Carcinin *Lv*1 (Tipo I), Carcinin *Lv*2 (Tipo I), Crustin *Lv* (Tipo IIa), *Lv*SWD (Tipo III) e *Lv*DWD (Tipo IV) no intestino de camarões (*Litopenaeus vannamei*) experimentalmente desafiados com a bactéria *Vibrio harveyi*.



Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. As barras brancas representam os valores médios de expressão relativa do Grupo Controle (camarões não desafiados) enquanto que as barras pretas representam os valores médios de expressão relativa do Grupo Experimental (12 horas após um desafio por imersão com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126). *Diferenças estatísticas entre as condições experimentais (*cutoff* de expressão = 2 vezes; $P < 0,05$) obtidas pelo teste t não-pareado.

A importância de Crustin *Lv* foi demonstrada *in vivo* (SHOCKEY et al., 2009). Após o silenciamento pós-transcricional de Crustin *Lv* pela técnica de RNAi, os níveis de mortalidade dos animais aumentaram. Uma vez que a expressão de Crustin *Lv* é exclusiva de hemócitos (WANG; CHANG; CHEN, 2007), o aumento da expressão desse gene no intestino pode ser o resultado do recrutamento de um número maior de hemócitos para essa área e/ou a modulação desse gene nos hemócitos ali presentes. Ademais, o aumento dos níveis transcricionais de Crustin *Lv* no intestino sugere que essa pode ser de fato uma área de grande aporte de patógenos no organismo.

A destruição das células epiteliais e da membrana peritrófica do intestino médio de *P. monodon* por *V. harveyi* (SOONTHORNCHAI et al., 2010) pode estar associada à atividade proteolítica das bactérias sobre

as células do intestino médio desses animais. A presença de transcritos de crustinas no intestino, em especial dos Tipos III e IV, sugere uma possível atividade antiproteolítica para combater a microbiota presente no lúmen intestinal. As crustinas do Tipo III de *P. monodon* (rSWDPm2) e *F. chinensis* (rSWDFc) possuem forte inibição contra proteases como a subtilisina A de *Bacillus licheniformis* (AMPARYUP; DONPUDSA; TASSANAKAJON, 2008; JIA et al., 2008). Além disso, crustinas do Tipo IV de *M. japonicus* apresentam inibição de proteases de *Bacillus subtilis* (CHEN; HE; XU, 2008). Interessantemente, as bactérias do gênero *Bacillus* estão presentes na microbiota intestinal de camarões peneídeos (CHAI et al., 2016; HILL; BAIANO; BARNES, 2009; NAVINCHANDRAN et al., 2014). Portanto, é possível que a atividade antiproteolítica das crustinas auxilie no controle das bactérias presentes no intestino. Atualmente, nenhum estudo acerca da atividade antiproteolítica de crustinas do Tipo I de *L. vannamei* foi realizado. Porém, uma vez que a expressão desses genes é maior no intestino em relação aos hemócitos, é possível que Carcinin Lv1 e Carcinin Lv2 controlem a comunidade microbiana do intestino através de uma atividade antiproteolítica. Nesse sentido, estudos acerca da atividade antiproteolítica dessas crustinas seriam interessantes para elucidar o conhecimento acerca das crustinas do Tipo I.

Por fim, este foi o primeiro trabalho do nosso grupo de pesquisas realizado pelo método de imersão, sendo esse um método que não gera injúrias ao animal e é adequado para se compreender as interações patógeno-hospedeiro. Ademais, foi observado que a expressão gênica das crustinas apresenta padrões de distribuição e modulação distintos. Foram descritas assinaturas referentes a expressão gênica de AMPs associando o número de transcritos com susceptibilidade a doenças (DE LORGERIL et al., 2008). Portanto, o estudo acerca da expressão gênica de crustinas em importantes tecidos/órgãos associados à imunidade de camarões, como os hemócitos e o intestino, pode, futuramente, ser utilizado na carcinicultura para seleção de indivíduos resistentes a doenças. Além disso, os AMPs possuem vantagens sobre os antibióticos que têm sido utilizados na aquicultura (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2016). Uma vez que esses compostos agem sobre componentes essenciais da

célula, o desenvolvimento de microrganismos resistentes é dificultado (HANCOCK; NIJNIK; PHILPOTT, 2012). Portanto, futuramente, os AMPs podem vir a substituir esses antibióticos. Porém, são necessários mais estudos acerca desses efetores imunológicos, em especial em possíveis sítios de infecção, para se elucidar a capacidade dessas moléculas.

6. PRINCIPAIS RESULTADOS

- Confirmou-se a presença de transcritos de crustinas nos hemócitos e intestino do camarão *Litopenaeus vannamei* e se verificou que os Tipos de crustinas (I a IV) são diferencialmente expressos nesses tecidos.

- Em camarões sadios, enquanto que as crustinas do Tipo I (Carcinin *Lv*1 e Carcinin *Lv*2) mostraram-se majoritariamente expressas no intestino, as crustinas do Tipo II (Crustin *Lv* e Crustin-like *Lv*), III (*Lv*SWD) e IV (*Lv*DWD) foram mais expressas nos hemócitos.

- Apenas a expressão gênica de Crustin *Lv* sofreu alteração no intestino frente a um desafio bacteriano pelo método de imersão. Nenhum dos genes analisados foi modulado nos hemócitos.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7.1. CONCLUSÃO

- As crustinas do camarão *L. vannamei* apresentam níveis distintos de expressão gênica basal nos hemócitos e no intestino, sendo que somente o gene Crustin *Lv* foi modulado no intestino após um desafio bacteriano.

7.2. PERSPECTIVAS

- Localizar os sítios de expressão das crustinas nos diferentes tecidos/órgãos de *L. vannamei* por imunohistoquímica e/ou hibridização *in situ* (HIS).

- Analisar o padrão temporal de expressão gênica de crustinas nos hemócitos e no intestino após um desafio microbiano pelo método de imersão.

- Analisar a expressão gênica das crustinas frente a desafios microbianos em outros órgãos que estão em contato com microrganismos, como as brânquias.

REFERÊNCIAS

- AMPARYUP, P. et al. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 4, p. 1085–1093, 2008.
- AMPARYUP, P.; DONPUDSA, S.; TASSANAKAJON, A. Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 12, p. 1497–1509, 2008.
- ANTONY, S. P.; BRIGHT SINGH, I. S.; PHILIP, R. Molecular characterization of a crustin-like, putative antimicrobial peptide, Ficrustin, from the Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 28, n. 1, p. 216–220, 2010.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances en la Inmunología del Camarón. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.). **Guía Técnica: Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**. 2. ed. Panamá: OIRSA, 2014. p. 237–304, 2014.
- BARRETO, C. **Identificação e caracterização molecular e transcricional de crustinas do tipo I no camarão peneídeo *Litopenaeus vannamei***. 2016. 89 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- BARRETO, C. et al. Specific molecular signatures for Type II crustins in penaeid shrimp uncovered by the identification of crustin-like antimicrobial peptides in *Litopenaeus vannamei*. **Marine Drugs**, v. 16, n. 1, p. 16, 2018.
- BARTLETT, T. C. et al. Crustins, Homologues of an 11.5-kDa Antibacterial peptide, from Two Species of Penaeid Shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. **Marine Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 278–293, 2002.
- BOONCHUEN, P. et al. Hemocyanin of *Litopenaeus vannamei* agglutinates *Vibrio parahaemolyticus* AHPND (VP AHPND) and neutralizes its toxin. **Developmental and Comparative Immunology**, v.

84, p. 371-381, 2018.

BROCKTON, V.; HAMMOND, J. A.; SMITH, V. J. Gene characterisation, isoforms and recombinant expression of carcenin, an antibacterial protein from the shore crab, *Carcinus maenas*. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 5, p. 943–949, 2007.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.

BROWN, E. M.; SADARANGANI, M.; FINLAY, B. B. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. **Nature Immunology**, v. 14, n. 7, p. 660–667, 2013.

BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 169–184, 2004.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CAVALLO, R. A.; STABILI, L. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). **Water Research**, v. 36, n. 15, p. 3719–3726, 2002.

CERENIUS, L. et al. Crustacean immunity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 708, p. 239–259, 2010.

CHAI, P. C. et al. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus* PC465 isolated from the gut of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 54, p. 602–611, 2016.

CHEN, D.; HE, N.; XU, X. *Mj*-DWD, a double WAP domain-containing protein with antiviral relevance in *Marsupenaeus japonicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, n. 6, p. 775–781, 2008.

COELHO, J. DA R. et al. A hemocyte-expressed fibrinogen-related protein gene (*LvFrep*) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*:

Expression analysis after microbial infection and during larval development. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 56, p. 123–126, 2016.

DAI, W.-F. et al. Starvation stress affects the interplay among shrimp gut microbiota, digestion and immune activities. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 80, p. 191–199, 2018.

DE LA VEGA, E. et al. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 7, p. 1916–1925, 2008.

DE LORGERIL, J. et al. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 12, p. 3438–3445, 2008.

DESTOUMIEUX-GARZON, D. et al. Antimicrobial Peptides in Marine Invertebrate Health and Disease. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 371, n. 1695, 2016.

DESTOUMIEUX, D. et al. Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 45, p. 28398–28406, 1997.

DESTOUMIEUX, D. et al. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 3, p. 461–469, 2000.

DONPUDSA, S. et al. Type I and type II crustins from *Penaeus monodon*, genetic variation and antimicrobial activity of the most abundant crustinPm4. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 47, n. 1, p. 95–103, 2014.

DU, Z. Q. et al. A double WAP domain (DWD)-containing protein with proteinase inhibitory activity in Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 154, n. 2, p. 203–210, 2009.

DU, Z. Q. et al. A single WAP domain (SWD)-containing protein with antipathogenic relevance in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 28, n. 1, p. 134–142, 2010.

DU, Z. Q.; YUAN, J. J.; REN, D. M. A novel single WAP domain-containing protein isoform with antibacterial relevance in *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 44, n. 2, p. 478–484, 2015.

FALCHETTI, M. L. B. **Caracterização molecular e do perfil transcricional do peptídeo antimicrobiano stylicina no camarão *Litopenaeus vannamei***. 2016. 79 p. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2012. FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nation; fisheries and aquaculture department**, 2012.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2016. FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nation; fisheries and aquaculture department**, 2016

GARGIONI, R.; BARRACCO, M. A. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. **Journal of Morphology**, v. 236, n. 3, p. 209–221, 1998.

GONCALVES, P. et al. Molecular signatures at imminent death: Hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 42, n. 2, p. 294–301, 2014.

GROSS, P. S. et al. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, n. 7, p. 565–577, 2001.

GUANÍ-GUERRA, E. et al. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. **Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 1–11, 2010.

GUILLAUME, J.; CECCALDI, H. J. Physiologie digestive des crevettes. In: GUILLAUME, J. et al. (Eds.). **Nutrition et alimentation des**

poissons et crustacés. 15. ed. França: INRA / IFREMER, 1999. p. 297–312.

HALE, J. D.; HANCOCK, R. E. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 5, n. 6, p. 951–959, 2007.

HANCOCK, R. E. W.; NIJNIK, A.; PHILPOTT, D. J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 243–254, 2012.

HENNIGHAUSEN, L. G.; SIPPEL, A. E. Mouse whey acidic protein is a novel member of the family of “four-disulfide core” proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 10, n. 8, p. 2677–2684, 1982.

HILL, J. E.; BAIANO, J. C. F.; BARNES, A. C. Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. **Journal of Fish Diseases**, v. 32, n. 12, p. 1007–1016, 2009.

JIANG, H. S. et al. A single whey acidic protein domain containing protein (SWD) inhibits bacteria invasion and dissemination in shrimp *Marsupenaeus japonicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 2, p. 310–318, 2013.

JIANG, H. S. et al. Four crustins involved in antibacterial responses in *Marsupenaeus japonicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 43, n. 2, p. 387–395, 2015.

JIMÉNEZ-VEGA, F. et al. A single WAP domain-containing protein from *Litopenaeus vannamei* hemocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 314, n. 3, p. 681–687, 2004.

JIMÉNEZ-VEGA, F.; VARGAS-ALBORES, F. A secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI)-like protein from *Litopenaeus vannamei* haemocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, n. 5, p. 1119–1126, 2007.

JIRAVANICHPAISAL, P. et al. Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: Characterization and expression pattern. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, n. 5, p. 441–455, 2007.

LI, F. et al. A double WAP domain-containing protein from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* with antimicrobial activities against Gram-negative bacteria and yeast. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 36, n. 1, p. 183–190, 2012.

LI, S. et al. A Double WAP Domain-Containing Protein Es-DWD1 from *Eriocheir sinensis* Exhibits Antimicrobial and Proteinase Inhibitory Activities. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–15, 2013.

LIU, N. et al. A novel crustin from *Marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 49, n. 2, p. 313–322, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MAEDA, M. Microbial communities and their use in aquaculture. In: Lee CS, O'Bryen P (eds) **Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems**. The World Aquaculture Society, p. 61–78, 2002.

MARTIN, G. G.; RUBIN, N.; SWANSON, E. *Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi* cause detachment of the epithelium from the midgut trunk of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 60, n. 1, p. 21–29, 2004.

MCGAW, I. J.; CURTIS, D. L. A review of gastric processing in decapod crustaceans. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 183, n. 4, p. 443–465, 2013.

NAVINCHANDRAN, M. et al. Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 36, n. 1, p. 38–45, 2014.

NICOLAS, P. Multifunctional host defense peptides: Intracellular-targeting antimicrobial peptides. **FEBS Journal**, v. 276, n. 22, p. 6483–6496, 2009.

PONPRATEEP, S. et al. Gene silencing reveals a crucial role for anti-

lipopolysaccharide factors from *Penaeus monodon* in the protection against microbial infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 32, n. 1, p. 26–34, 2012.

QUISPE, R. L. et al. Transcriptional profiling of immune-related genes in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during ontogenesis. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 58, p. 103–107, 2016.

RAMIREZ, J. L. et al. The role of hemocytes in *Anopheles gambiae* antiplasmodial immunity. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 2, p. 119–128, 2014.

RANGANATHAN, S. et al. The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 17, n. 2, p. 106–113, 134–136, 1999.

RELF, J. M. et al. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, n. 2, p. 350–357, 1999.

ROLLAND, J. L. et al. Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 6, p. 1269–1277, 2010.

ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Invertebrate Survival Journal**, v. 7, n. 1, p. 262–284, 2010.

SARAIVA, R. G. et al. Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 64, p. 53–64, 2016.

SAULNIER, D. et al. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: A review. **Aquaculture**, v. 191, n. 1–3, p. 133–144, 2000.

SHOCKEY, J. E. et al. The role of crustins in *Litopenaeus vannamei* in response to infection with shrimp pathogens: An in vivo approach. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, n. 5, p. 668–673, 2009.

SILVEIRA, A. S. et al. An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings

insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 79, p. 44–50, 2018.

SMITH, V. J. et al. Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 7, p. 758–772, 2008.

SMITH, V. J. Phylogeny of whey acidic protein (WAP) four-disulfide core proteins and their role in lower vertebrates and invertebrates. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 5, p. 1403–1408, 2011.

SOONTHORNCHAI, W. et al. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, n. 1, p. 19–28, 2010.

SPERSTAD, S. V. et al. Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, n. 4, p. 583–591, 2009.

SULEIMAN, S.; SMITH, V. J.; DYRYNDA, E. A. Unusual tissue distribution of carcinin, an antibacterial crustin, in the crab, *Carcinus maenas*, reveals its multi-functionality. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 76, p. 274–284, 2017.

SUN, B.; WANG, Z.; ZHU, F. The crustin-like peptide plays opposite role in shrimp immune response to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus (WSSV) infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 66, p. 487–496, 2017.

SUTHIANTHONG, P. et al. A double WAP domain-containing protein *PmDWD* from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* is involved in the controlling of proteinase activities in lymphoid organ. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, n. 3, p. 783–790, 2011.

TASSANAKAJON, A.; SOMBOONWIWAT, K.; AMPARYUP, P. Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 48, n. 2, p. 324–341, 2015.

TRAN, L. et al. Determination of the infectious nature of the agent of

acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 105, n. 1, p. 45–55, 2013.

TZOU, P. et al. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 737–748, 2000.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 34–1, 2002.

VISETNAN, S. et al. A single WAP domain-containing protein from *Litopenaeus vannamei* possesses antiproteinase activity against subtilisin and antimicrobial activity against AHPND-inducing *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 68, p. 341–348, 2017.

WANG, L. et al. Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, n. 6, p. 1285–1291, 2012.

WANG, X.-W.; WANG, J.-X. Crustacean hemolymph microbiota: Endemic, tightly controlled, and utilization expectable. **Molecular Immunology**, v. 68, n. 2, p. 404–411, 2015.

WANG, Y. C.; CHANG, P. S.; CHEN, H. Y. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, n. 6, p. 1161–1177, 2007.

YOUNT, N. Y. et al. Advances in Antimicrobial Peptide Immunobiology. **Biopolymers**, v. 84, n. 80, p. 435–458, 2006.

ZHANG, H. W. et al. Characterization of a double WAP domain-containing protein from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 71, n. August, p. 329–337, 2017.

ZHANG, J. et al. Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 4, p. 605–614, 2007.

ZHANG, Z.; ZHU, S. Comparative genomics analysis of five families of antimicrobial peptide-like genes in seven ant species. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 38, n. 2, p. 262–274, 2012.